气味结合蛋白 MmedOBP19 在中红侧沟茧蜂足部的表达及配体结合特征

杨叶青[1,2]，王山宁[2]，彭　勇[1,2]，单　双[2]，郑　瑶[2]，李瑞军[1,*]，张永军[2,*]，郭予元[2]

（1. 河北农业大学植物保护学院，河北保定 071000；2. 中国农业科学研究院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193）

摘要：【目的】明确气味结合蛋白基因 *MmedOBP*19 在中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 足部的表达定位及重组 MmedOBP19 的配体结合特征。【方法】利用扫描电镜观察化学感器在中红侧沟茧蜂足部的分布，通过原位杂交研究 *MmedOBP*19 在中红侧沟茧蜂雌蜂前足中的表达定位，并采用荧光竞争结合实验分析 MmedOBP19 重组蛋白与 86 种潜在配体的结合特征。【结果】扫描电镜观察发现，中红侧沟茧蜂的足部主要分布 3 种类型的感器，分别是毛形感器、刺形感器和锥形感器。原位杂交结果显示，*MmedOBP*19 的表达主要集中在中红侧沟茧蜂前足跗节的感器下方。重组 MmedOBP19 与配体的结合力测定结果显示，MmedOBP19 与非挥发性植物次生物质包括棉酚（$K_i = 2.32 \pm 0.17$ μmol/L）、硫酸黄连素（$K_i = 4.86 \pm 1.81$ μmol/L）、槲皮素（$K_i = 4.93 \pm 0.21$ μmol/L）、单宁（$K_i = 5.23 \pm 0.38$ μmol/L）、芸香叶苷（$K_i = 5.91 \pm 0.26$ μmol/L）和奎宁（$K_i = 6.05 \pm 0.51$ μmol/L）等具有较强的结合能力，同时能够结合油酸（$K_i = 4.32 \pm 1.73$ μmol/L）及亚油酸（$K_i = 3.55 \pm 0.44$ μmol/L），但与柠檬烯（$K_i = 12.65 \pm 2.55$ μmol/L）的结合力较弱。【结论】推测中红侧沟茧蜂足部具有化学感受功能，MmedOBP19 主要参与中红侧沟茧蜂足部味觉识别过程。

关键词：中红侧沟茧蜂；气味结合蛋白；感器；超微结构；原位杂交；荧光竞争结合实验；化学感受

中图分类号：Q968　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2017)06-0613-08

Expression of the odor binding protein MmedOBP19 in the legs of *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae) and its ligand binding characteristics

YANG Ye-Qing[1,2], WANG Shan-Ning[2], PENG Yong[1,2], SHAN Shuang[2], ZHENG Yao[2], LI Rui-Jun[1,*], ZHANG Yong-Jun[2,*], GUO Yu-Yuan[2] (1. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract:【Aim】This study aims to investigate the expression of the odor binding protein gene *MmedOBP*19 in the sensilla in legs of the braconid wasp *Microplitis mediator* and the ligand binding characteristics of recombinant MmedOBP19.【Methods】The ultrastructure of sensilla on the legs of female and male adults of *M. mediator* was observed by using scanning electron microscope. The *in situ* hybridization assays were conducted to explore the expression of *MmedOBP*19 in the forelegs of female adults of *M. mediator*. The fluorescence-based competitive binding assays were performed to measure the binding abilities of the recombinant MmedOBP19 to 86 candidate ligand compounds.【Results】There are three kinds of morphological sensilla on the legs of adult wasps, including sensilla trichodea, sensilla chaetica and sensilla basiconica, amongst which sensilla basiconica with two pores on the tip belong to

基金项目：国家自然科学基金项目(31471778, 31672038, 31621064)

作者简介：杨叶青，女，1991 年 5 月生，河北邢台人，硕士研究生，研究方向为昆虫分子化学生态学，E-mail：yangyeqing66@126.com

* 通讯作者 Corresponding authors, Email：liruijun99@sina.com；yjzhang@ippcaas.cn

收稿日期 Received：2017-03-06；接受日期 Accepted：2017-04-27

taste sensilla. The *in situ* hybridization analysis showed that the expression of *MmedOBP*19 was concentrated at the base of the sensilla in tarsi of the foreleg. The results of fluorescence-based competitive binding assays revealed that the recombinant MmedOBP19 had strong affinities with non-volatile plant secondary metabolites, such as gossypol (K_i = 2.32 ± 0.17 μmol/L), berberine sulphate (K_i = 4.86 ± 1.81 μmol/L), quercetin (K_i = 4.93 ± 0.21 μmol/L), tannin (K_i = 5.23 ± 0.38 μmol/L), rutin (K_i = 5.91 ± 0.26 μmol/L) and quinine (K_i = 6.05 ± 0.51 μmol/L). In addition, MmedOBP19 could bind to octadecenoic acid (K_i = 4.32 ± 1.73 μmol/L) and linoleic acid (K_i = 3.55 ± 0.44 μmol/L), but had a weak binding ability with limonene (K_i = 12.65 ± 2.55 μmol/L). 【Conclusion】Legs of *M. mediator* wasps might be involved in chemical communication behavior, and MmedOBP19 in the legs of *M. mediator* wasps may play major roles in taste perception.

Key words: *Microplitis mediator*; odorant binding protein; sensilla; ultrastructure; *in situ* hybridization; fluorescence-based competitive binding assay; chemoreception

昆虫主要通过嗅觉和味觉识别外界的化学信号,化学感知在昆虫的觅食、交配和躲避天敌活动中起着至关重要的作用(Dethier and Crnjar, 1982)。昆虫在长期的进化过程中,形成了一套精密的嗅觉和味觉感受系统。嗅觉感器主要分布在昆虫的触角,而味觉感器主要分布在下颚须、足的跗节、内唇和咽等部位,每一个感器内都分布着不同的神经元(味觉受体神经元或嗅觉受体神经元)(汤清波等, 2011)。感器作为昆虫体壁特化的一部分表皮,能够感应外界环境的化学刺激(余海忠, 2007)。外界刺激物质通过感器微孔进入到感器腔,与感器淋巴液中的水溶性蛋白相互作用并被运输到化学受体神经元,从而激活受体蛋白将化学信号转换为电信号,并通过神经轴突以脉冲的形式传送到中枢神经系统(central nervous system, CNS)进行整合,然后 CNS 输出调控行为的指令信息,昆虫对刺激物质做出相应行为响应(Schoonhoven *et al*., 2005)。

昆虫气味结合蛋白(odor binding proteins, OBPs)是一类小分子水溶性蛋白(120~150 个氨基酸,大小约 14 kD)。OBPs 一般含有 6 个保守的半胱氨酸残基,交互形成 3 个二硫键(Leal *et al*., 1999; Scaloni *et al*., 1999; Tegoni *et al*., 2004),并且具有一个由 α-螺旋形成的疏水性结合口袋,能够结合多种配体化合物(Pelosi *et al*., 2014)。根据半胱氨酸的数目及结构,OBPs 可以分为 Plus-C OBPs, Minus-C OBPs, Classic OBPs 和 Atypical OBPs (Hekmatscafe *et al*., 2002; Zhou *et al*., 2008; Zhou, 2010)。依据识别配体的类型,OBPs 可分为性信息素结合蛋白(pheromone binding proteins, PBPs)、普通气味结合蛋白(general odorant binding proteins, GOBPs)和触角结合蛋白(antennal binding protein X, ABPX)三大类,其中 PBPs 与昆虫感受性外激素有关,而其他 OBPs 则主要参与普通气味物质的识别(Robertson *et al*., 1999)。第一个被鉴定出的昆虫气味结合蛋白是多音天蚕蛾 *Antheraea polyphemus* 的 PBP,该蛋白特异地表达在雄蛾的触角中(Vogt and Riddiford, 1981)。一般认为,昆虫触角中高表达的 OBPs 与嗅觉识别相关,甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 的 PBP1 和 PBP2(Xiu and Dong, 2007)以及大螟 *Sesamia inferens* 的 OBP5 和 OBP6 等(Zhang *et al*., 2013)都特异地在触角中表达。随着研究的深入,科学家发现 OBPs 不仅在昆虫触角中表达,同时在味觉器官中也有表达。例如,黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 OBP19c 在昆虫的味觉感器中表达(Galindo and Smith, 2001),飞蝗 *Locusta migratoria* 的 OBP2 主要表达在口器中(Yu *et al*., 2009),三点盲蝽 *Adelphocoris fasciaticollis* 和中黑盲蝽 *Adelphocoris suturalismirid* 的 OBP11 高表达在盲蝽的口针组织中(魏宇, 2016)。果蝇中的 OBP28a 具有味觉功能(Swarup *et al*., 2014)。OBPs 不仅参与昆虫的嗅觉识别行为,同样在味觉感知活动中也发挥重要作用(Shanbhag *et al*., 2001; Jeong *et al*., 2013)。

中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 隶属于膜翅目(Hymenoptera)茧蜂科(Braconidae),是一种寄主非常广泛的内寄生蜂,可以寄生鳞翅目夜蛾科和尺蛾科 40 多种昆虫,包括棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、粘虫 *Mythimna separata*、甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 等重大农业害虫,在害虫综合治理策略中扮演着非常重要的角色(Arthur and Mason, 1986)。大量研究表明,嗅觉和味觉感受系统在中红侧沟茧蜂寻找寄主的过程中发挥重要作用。本实验室前期通过触角转录组测序鉴定获得 20 个中红侧沟茧蜂气味结合蛋白。组织表达谱表明,气味结合蛋白 MmedOBP19 在中红侧沟茧蜂成虫的足中高表达,推

测其可能参与足部化学感知功能(彭勇等,未发表数据)。有鉴于此,本研究利用扫描电镜观察化学感器在中红侧沟茧蜂足部的分布,通过原位杂交研究 *MmedOBP*19 在中红侧沟茧蜂前足中的表达定位,并采用荧光竞争结合实验分析 MmedOBP19 重组蛋白的配体结合特征。相关结果有助于解析寄生蜂化学感知行为。

1 材料与方法

1.1 供试虫源和主要试剂

试虫:本研究所用的中红侧沟茧蜂由河北省农林科学院植物保护研究所提供。蜂茧置于温度28 ± 1℃,相对湿度 60%,光周期 14L:10D 的智能人工气候箱中羽化。成虫羽化后饲喂 10% 蜂蜜水补充营养。

试剂及其生产厂家:总 RNA 提取试剂 Trizol, Invitrogen 公司;反转录试剂盒(FastQuant RT Kit)和 BL21(DE3)感受态细胞,天根生化科技有限公司; pEASY-T3 克隆试剂盒,北京全式金生物技术公司; DNA 胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒,Axygen 公司;限制性内切酶,TaKaRa 公司;Biotin RNA Labeling Mix 试剂盒,Roche 公司;SSC(20 ×), ThermoFisher 公司;TSA Fluorescence Systems 试剂盒,PerkinElmer 公司;冷冻包埋剂(OCT),Sakura 公司;高亲和 Ni-NTA 纯化介质,金斯瑞生物科技公司;重组肠激酶,Novagen 公司;荧光探针 1-NPN 和配体标样,Sigma-Aldrich 公司。

1.2 中红侧沟茧蜂足部扫描电镜样品制备

取当天羽化雌蜂和雄蜂各 5 头,在体视显微镜下用解剖镊子分别取前足、中足和后足,并置于 75% 的酒精中。随后,分别用 70%, 80%, 90%, 95% 和 100% 的酒精进行梯度脱水处理,每个梯度各处理 10 min。处理好的样品置于日立 HCP-2 CO_2 临界点干燥仪内干燥 2 h,随后用导电胶布将样品固定在样品台上,采用日立 IB-5 离子镀膜仪进行喷金。最后,在 Quanta 200F 扫描电镜下对样品进行观察拍照。

1.3 RNA 提取与 cDNA 合成

参照试剂操作说明书,采用 Trizol 法提取中红侧沟茧蜂足的总 RNA。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo, 美国)检测 RNA 样品质量。随后,按照反转录试剂盒说操作明书合成 cDNA。

1.4 *MmedOBP*19 生物素标记探针的合成

采用 Primer 3 软件(http://primer3.ut.ee/)设计 *MmedOBP*19 基因特异性引物。上游引物序列:5′-TCGGTTGTGGTTTTGAGTGAATC-3′;下游引物序列:5′-GGGCTGTTTCACATTGGTCATTA-3′。以 cDNA 为模板,在 PCR 仪中扩增 *MmedOBP*19 核苷酸序列。RT-PCR 的反应体系为 25 μL:cDNA 模板 1μL,2 × Taq Mixture 12.5 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,灭菌水 9.5 μL。PCR 反应程序:94℃ 4 min; 94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 45 s,35 个循环;72℃ 10 min。取 5 μL 扩增产物通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。随后,取 5 μL PCR 产物与 1 μL pEasy-T3 载体室温连接 5 min,转化到感受态细胞进行蓝白斑筛选,随机挑选 10 个阳性克隆进行测序。

根据重组质粒 pEasy-T3-*MmedOBP*19 的序列,选择 *Sac* Ⅰ限制性内切酶对重组质粒进行线性化处理。以线性化的质粒为模板,按照操作说明书使用 Biotin RNA Labeling Mix 试剂盒合成生物素 Biotin 标记的 RNA 探针。合成后的标记产物加入杂交缓冲液稀释至 100 ng/μL。

1.5 原位杂交

用镊子取羽化当天的雌蜂前足,包埋于 OTC 中。利用 Thermo™ CryoStar NX50 冷冻切片机将样品切成 12 μm 厚的薄片,并粘附至载玻片上(Fisher Scientific, 美国)。将样品置于室温干燥 15 min,随后置于固定液(0.1 mol/L $NaHCO_3$,4% 多聚甲醛, pH 9.5)中 4℃ 固定 30 min。固定好的样品按照以下步骤进行处理:PBS(0.85% NaCl, 1.4 mmol/L KH_2PO_4, 8 mmol/L Na_2HPO_4, pH 7.1)洗 1 min;0.2 mol/L HCl 溶液孵育 10 min;含 1% Triton X-100 的 PBS 洗 2 min;PBS 洗 2 次,每次 1 min;杂交液(50% 甲酰胺,5 × SSC,10% 硫酸葡聚糖,200 μg/mL yeast tRNA,200 μg/mL herring sperm)中 60℃ 孵育 1 h。预杂交结束后,加入含有探针的杂交液 60℃ 杂交过夜。0.2 × SSC 溶液 60℃ 清洗 3 次,每次 20 min,随后用 TBS(100 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7.5)冲洗 1 min;加入封闭液(含 1% blocking solution 和 0.03% Triton X-100 的 TBS)室温封闭 30 min;封闭后加入含有 Strep-HRP(用封闭液 1:100 稀释)的封闭液,37℃ 孵育 1 h;用含有 0.05% Tween 20 的 TBS(TBST)清洗 3 次,每次 5 min;按照 TSA Fluorescence Systems 试剂盒说明书加入 TSA 底物,室温孵育 10 min;反应结束后用 TBST 清洗;封片后在蔡司激光共聚焦显微镜下观察并拍照,激发

波长为 494 nm。

1.6 MmedOBP19 重组蛋白表达和纯化

根据 *MmedOBP*19 基因序列,设计去信号肽序列的引物进行 PCR 扩增。上游引物序列:5′-TACTCACCATGGGAGCGATAACTGCCGAAGAT-3′;下游引物序列:5′-TACTCACTCGAGTTATCCCAGGATAAGATTTGG-3′;下划线分别表示 *Nco* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 酶切位点。PCR 扩增方法参照 1.4 节。按照操作说明书对目的片段进行双酶切,并通过 T4 连接酶将目的片段连接至 pET-30a(+)表达载体,获得 pET30a/*MmedOBP*19 重组质粒后,转化至 BL21(DE3)感受态细胞中进行诱导表达。利用在线软件 ExPASy(http://web.expasy.org/compute_pi/)预测重组目标蛋白分子量。

将正确克隆培养至 OD_{600} 在 0.6~0.8 之间,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,18℃ 180 r/min 诱导过夜,离心收集菌体,超声破碎后,收集包涵体,用于蛋白纯化。包涵体处理步骤如下:用溶液Ⅰ(50 mmol/L Tris, 0.2% Triton X-100, pH 6.8)清洗包涵体沉淀,离心收集沉淀;加入 10 mL 的 6 mol/L 盐酸胍溶解沉淀,溶解后加入 10 mL 溶液Ⅱ(10 mmol/L 二硫苏糖醇, 200 mmol/L Tris, pH 8.0),室温 100 r/min 孵育 60 min;加入 4 mL 溶液Ⅲ(100 mmol/L 胱氨酸, 0.5 mol/L 氢氧化钠)孵育 10 min,以氧化溶液中剩余的二硫苏糖醇;加入 10 倍体积的溶液Ⅳ(5 mmol/L 半胱氨酸, 100 mmol/L Tris, pH 8.0),室温 100 r/min 孵育过夜。包涵体处理结束后,离心收集上清并用截留分子量为 10 kD 的超滤管进行超滤。超滤后溶液装入截留分子量为 10 kD 的透析袋在 5 L 的 1×PBS 蛋白缓冲液中 4℃ 透析过夜,利用高亲和 Ni-NTA 纯化介质对蛋白进行纯化。纯化后的蛋白用肠激酶去除 His 标签,酶切后再次利用高亲和 Ni-NTA 介质纯化。

1.7 荧光竞争结合实验

本试验使用 F-380 荧光分光光度计(天津,东港),所用容器为 1 cm 的石英杯。仪器设置参数为:激发波长 337 nm,发射波长范围 380~500 nm,狭缝宽度 10 nm,灵敏度设为 3。比色皿中加入 2 mL 浓度为 2 μmol/L 重组 MmedOBP19 蛋白溶液,依次加入荧光探针 1-NPN,使其终浓度由 1 μmol/L 增至 8 μmol/L,并扫描记录相应的荧光信号。利用 Scatchard 方程计算 MmedOBP19/1-NPN 的结合常数(Ban *et al*., 2003)。

以色谱级甲醇作为溶剂,配制 1 mmol/L 的配体样品。在含有 2 mL 50 mmol/L Tri-HCl 缓冲液(pH 7.4)的石英杯中加入重组蛋白和 1-NPN,终浓度均为 2 μmol/L。将配体样品梯度加入到混合液中,终浓度由 2 μmol/L 递增至 10 μmol/L(甲醇终浓度为 24.7 mmol/L),扫描记录荧光变化情况。根据公式 $K_i = [IC_{50}]/(1 + [1\text{-NPN}]/K_{1\text{-NPN}})$ 计算重组蛋白 MmedOBP19 与配体的结合常数 K_i。其中 $[IC_{50}]$ 代表 MmedOBP19/1-NPN 复合物的荧光强度下降至一半时所加入配体的浓度,[1-NPN] 代表未结合的 1-NPN 的浓度,$K_{1\text{-NPN}}$ 代表 MmedOBP19/1-NPN 的结合常数(Gu *et al*., 2011)。

2 结果

2.1 中红侧沟茧蜂足的感器类型

根据昆虫足的基本构造,中红侧沟茧蜂的足分为 6 节:分别是基节、转节、腿节、胫节、跗节和前跗节。利用扫描电镜对中红侧沟茧蜂前、中和后足各节进行观察,发现寄生蜂的足主要分布 3 种类型的感器:毛形感器(sensilla trichodea)、刺形感器(sensilla chaetica)和锥形感器(sensilla basiconica)(图 1)。

毛形感器是胸足分布最广、数量最多的感器类型,呈毛状。该感器的基部插入表皮隆起的基座中,表面具明显纵纹,端部逐渐变细,末端呈锥状。根据毛形感器的大小及分布位置,可进一步将其分为毛形感器 STⅠ和毛形感器 STⅡ。STⅠ大量分布在胸足的每一节,细长形,长度变异较大,约 17~40 μm,基部直径约 1.0~1.7 μm(图 1: A)。STⅡ分布数量较少,主要分布在跗节各亚节的末端,长度约为 27~40 μm,基部直径约为 4~5 μm,明显粗于 STⅠ(图 1: B)。

刺形感器,呈短刺状,顶端较钝,表面光滑,基部插入表皮凹陷处,与胸足的纵轴成直角。刺形感器明显短于其他类型感器,最短约 5 μm,最长约 10 μm(图 1: C)。刺形感器在胸足的分布数量较少,主要集中在基节与身体的连接处,在基节与转节的节间处也发现该感器的分布。

锥形感器,由基部到端部逐渐变细,如锥状,尖端钝圆,表面有纵纹,明显比毛形感器更加垂直于胸足的纵轴,锥形感器长约 14~20 μm,基部直径约 1.3~1.7 μm,端部具孔状结构(图 1: D-F)。锥形感器在雌蜂和雄蜂的前足、中足和后足中均有分布,主要集中在胸足跗节的各亚节,并且雌蜂锥形感器的数量多于雄蜂。

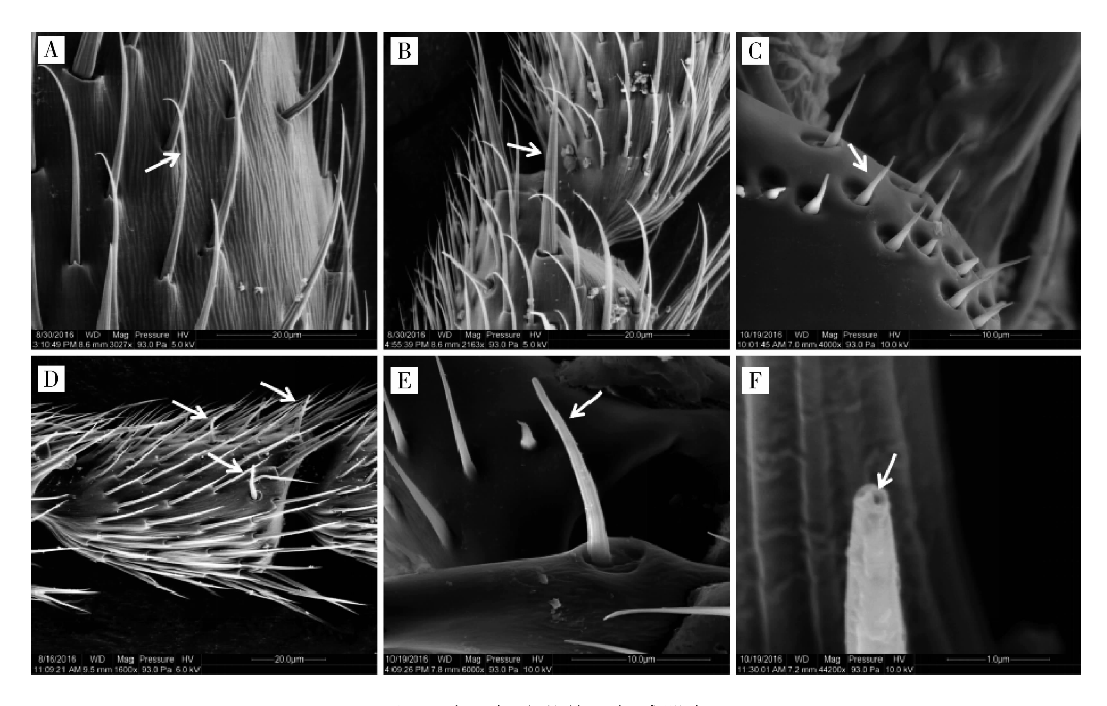


图 1　中红侧沟茧蜂足部感器类型

Fig. 1　Types of sensilla in the legs of *Microplitis mediator* adults

A：毛形感器 ST Ⅰ Sensilla trichodea Ⅰ；B：毛形感器 ST Ⅱ Sensilla chaetica Ⅱ；C：刺形感器 Sensilla chaetica；D－F：锥形感器 Sensilla basiconica. 每种感器由白色箭头标出。Each type of sensilla is indicated with white arrow.

2.2　*MmedOBP*19 在前足中的表达

利用生物素标记的 *MmedOBP*19 探针结合原位杂交技术，对 *MmedOBP*19 在中红侧沟茧蜂前足中的表达进行检测。杂交结果显示，绿色荧光标记的杂交信号主要分布在前足的跗节，并且标记的细胞团主要集中在表皮下方，这与锥形感器在跗节的分布特征一致。阴性对照中未检测到特异性荧光信号，表明绿色标记的荧光信号为特异性杂交信号（图 2）。



图 2　*MmedOBP*19 在中红侧沟茧蜂前足的表达

Fig. 2　Expression of *MmedOBP*19 in the foreleg of *Microplitis mediator* adults

2.3　MmedOBP19 重组蛋白的表达及配体结合特征

SDS-PAGE 结果表明，MmedOBP19 蛋白在上清中仅有少量表达，而在包涵体中大量表达，最终选择包涵体进行蛋白纯化。重组蛋白经过亲和层析纯化及肠激酶切后得到较纯的 MmedOBP19 蛋白，目的蛋白条带大小与预测的分子量大小（13 kD）基本一致，浓度为 1.5 mg/mL（图 3）。

以 1-NPN 作为荧光探针进行荧光竞争结合试验，通过 Scatchard 方程绘制回归曲线计算出 MmedOBP19 和 1-NPN 复合物的结合常数为 3.86 μmol/L（图 4）。MmedOBP19 与 86 种化合物的结合能力结果显示，非挥发性植物次生物质包括棉酚、硫酸黄连素、槲皮素、单宁、芸香叶苷和奎宁能够较强地与 MmedOBP19 结合，重组 MmedOBP19 也能够结合低挥发性化合物油酸及亚油酸，但与柠檬烯的结

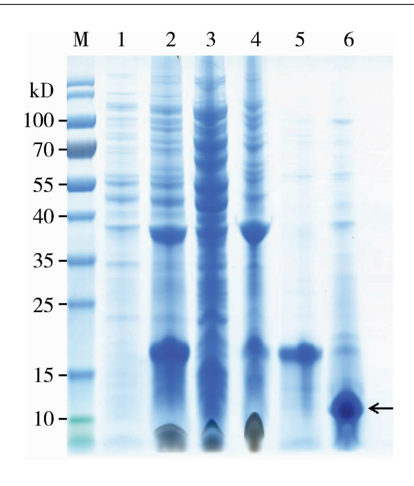


图 3　MmedOBP19 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3　SDS-PAGE analysis of the recombinant MmedOBP19

M：蛋白质分子量标准物 Protein molecular weight marker；1：未诱导菌体 Non-induced *Escherichia coli*；2：诱导菌体 Induced *E. coli*；3：上清液 Supernatant；4：包涵体 Inclusion body；5：纯化后蛋白 Purified protein；6：去标签蛋白 Protein without His-tag. 箭头指示 MmedOBP19 条带。The MmedOBP19 band is marked by an arrow.

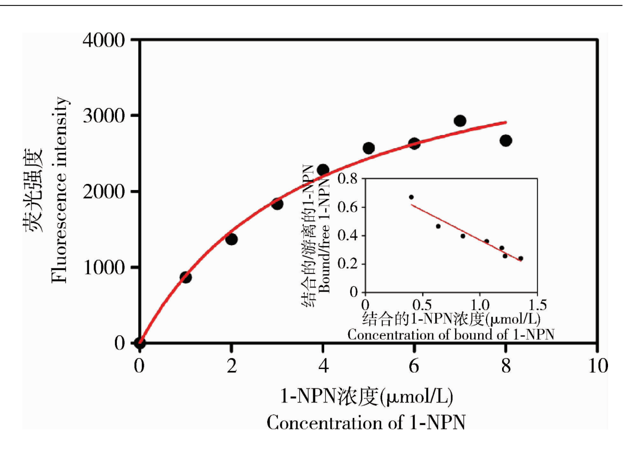


图 4　1-NPN 和重组蛋白 MmedOBP19 的结合曲线及 Scatchard 方程

Fig. 4　The binding curve and relative Scatchard plot of 1-NPN and MmedOBP19

合力较弱(图 5)。其中,重组 MmedOBP19 与棉酚的结合能力最强,结合常数为 2.32 ± 0.17 μmol/L(表 1)。不能有效结合的配体化合物包括:橙花叔醇、桉叶油醇、芳樟醇、(-)-4-萜品醇、异辛醇、香茅醇、2-己醇、正己醇、3-甲基-1-丁醇、反-2-己烯醇、3-环己烯-1-甲醇、1-戊醇、叶醇、正辛醇、乙酸丁酯、乙酸戊脂、乙酸己酯、乙酸正辛酯、乙酸叶醇酯、乙酰丙酸丁酯、丙酸丁酯、丙酸异丁酯、丙烯酸丁酯、丙烯酸己酯、丙烯酸环己酯、丁酸乙酯、丁酸戊酯、丁酸-反-2-己烯酯、己酸己酯、苯乙酸乙酯、水杨酸甲酯、2-甲基丁酸叶醇酯、3,4-二甲基苯甲醛、4-乙基苯甲醛、壬醛、苯甲醛、辛醛、反-2-己烯醛、戊醛、己醛、癸醛、庚醛、β-石竹烯、α-蒎烯、月桂烯、β-蒎烯、莰烯、4,8-二甲基-1,3,7-壬三烯 (DMNT))、(*E*,*E*)-4,8,12-三甲基-1,3,7,11-十三碳四烯(TMTT)、2-己酮、3-己酮、2-庚酮、6-甲基-5-庚烯-2-酮、β-紫罗兰酮、间二甲苯、乙酰苯、十一烷、萘、2-甲基萘、吲哚、香芹酚、硬脂酸、棕榈酸、水杨苷、柚皮苷、茶碱、咖啡因、儿茶酚、表儿茶素、阿托品、蔗糖、葡萄糖、2k-木糖、海藻糖和α-果糖,它们的结合常数均大于 50 μmol/L。

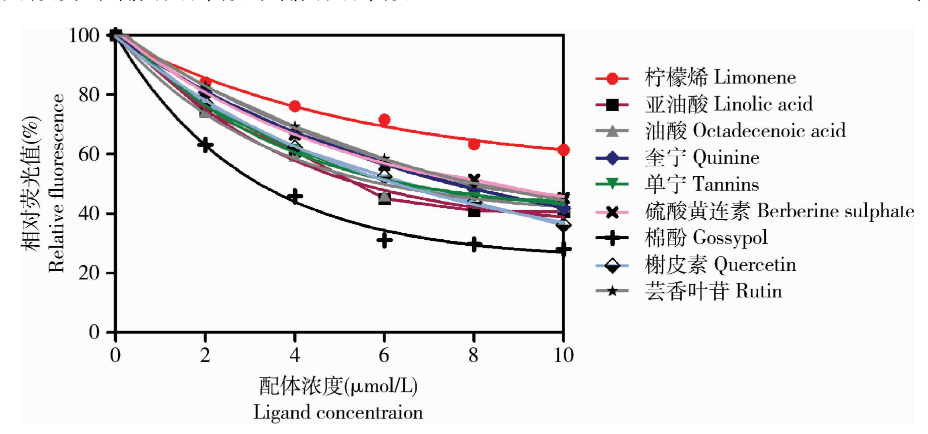


图 5　MmedOBP19 与 9 种配体的竞争结合曲线

Fig. 5　Competitive binding curves of MmedOBP19 to nine ligands

3　讨论

昆虫的化学感受器不仅集中在化学感觉器官上,在许多非化学感觉器官上也有分布。本研究通过扫描电镜对中红侧沟茧蜂胸足的化学感受器类型进行观察,结果发现,中红侧沟茧蜂足部主要分布 3 种类型的感器:毛形感器、刺形感器和锥形感器,这

表 1　MmedOBP19 与配体结合特性
Table 1　Binding properties of MmedOBP19 with different ligands

配体 Ligands	CAS 登录号 CAS no.	IC_{50} (μmol/L)	K_i (μmol/L)
柠檬烯 Limonene	5989-27-5	15.25	12.65 ± 2.55
油酸 Octadecenoic acid	112-80-1	4.90	4.32 ± 1.73
亚油酸 Linolic acid	60-33-3	4.78	3.55 ± 0.44
硫酸黄连素 Berberine sulphate	316-41-6	7.25	4.86 ± 1.81
棉酚 Gossypol	303-45-7	3.27	2.32 ± 0.17
单宁 Tannins	1401-55-4	6.65	5.23 ± 0.38
奎宁 Quinine	130-95-0	7.05	6.05 ± 0.51
槲皮素 Quercetin	117-39-5	6.54	4.93 ± 0.21
芸香叶苷 Rutin	153-18-4	7.80	5.91 ± 0.26

3 种感器分别与中红侧沟茧蜂触角中的毛形感器、刺形感器和锥形感器形态相似（董文霞和张钟宁，2006；李科明等，2012）。通常，化学感受器外部的主要形态特征是具有壁孔（嗅觉感器）或顶孔（味觉感器）（Zacharuk *et al*., 1980）。中红侧沟茧蜂胸足毛形感器和刺形感器的感器壁与顶端均未发现微孔，而在锥形感器顶端具有明显的孔状结构。一般认为，毛形感器和刺形感器为机械感受器，锥形感器为味觉感受器。目前，关于味觉感器在昆虫足部的分布及味觉功能已在多种昆虫中报道（Zhang *et al*., 2010, 2011）。鳞翅目昆虫成虫足上的味觉感器在其寻找产卵位置的过程中发挥重要作用（Chun and Schoonhoven, 1973）。果蝇的足部也分布着味觉感器，前足味觉感器内的化学受体介导非挥发的性信息素识别（Koh *et al*., 2014），因此前足可能在果蝇配偶的识别过程具有重要作用。

气味结合蛋白在昆虫外周化学感器识别外界刺激的过程中发挥着重要作用。研究发现 OBPs 不仅存在于昆虫嗅觉感器中，在味觉器官也有表达（Shanbhag *et al*., 2001；Ma *et al*., 2016）。本实验室前期研究发现，*MmedOBP*19 在中红侧沟茧蜂的足中高水平表达（彭勇，未发表数据），暗示着 MmedOBP19 可能参与足的化学信息感知。本研究通过原位杂交技术进一步发现该基因的表达主要集中在足跗节的表皮下方。通常，OBP 蛋白是由辅助细胞合成并进一步分泌到化学感器淋巴液中（Steinbrecht, 1992）。由于原位杂交技术仅从核酸水平对 OBP 基因进行细胞定位，因此很难将 OBP 基因定位到具体的感器中。结合足部扫描电镜观察的结果，锥形感器主要分布在足的跗节，并且是足部唯一的化学感受器类型。因此，推测 *MmedOBP*19 可能也在中红侧沟茧蜂足的锥形感器中表达。

通常来说，基因的功能往往与其表达的位置有关，*MmedOBP*19 在足部味觉感器的表达，表明其可能与味觉物质的识别有关。本研究选取了 86 种配体化合物与重组 MmedOBP19 进行荧光竞争结合实验，这些配体化合物包括 68 种挥发物、13 种非挥发性植物次生物质和 5 种糖类物质。研究发现，MmedOBP19 主要与非挥发性物质如棉酚、硫酸黄连素、槲皮素、单宁、芸香叶苷和奎宁等具有强的结合能力，表明 MmedOBP19 可能主要介导非挥发性信息化合物的识别并参与足的味觉识别行为，这与其基因在足中的表达特征相一致。昆虫可以利用胸足接触环境中的物质，足部的化学感器可对环境中潜在的信息化合物进行最初的判断。寄生蜂可能通过足部化学感器检测寄主残留在植物上的示踪物或用来感受异性个体的非挥发信息素。然而，就目前的结合实验结果来看，很难推断 MmedOBP19 蛋白具体参与了中红侧沟茧蜂足部化学感知的哪一环节。另外，重组 MmedOBP19 还可以微弱地结合挥发性物质柠檬烯，暗示其在中红侧沟茧蜂足的化学感知过程中可能具有多重功能。因此，MmedOBP19 在中红侧沟茧蜂足部的蛋白定位及化学识别功能仍需要深入研究。下一步拟开展的工作包括通过免疫组织化学技术从蛋白水平对 MmedOBP19 在足部感器进行定位，利用 RNAi 或基因编辑技术敲除 *MmedOBP*19，观察缺失靶标基因对中红侧沟茧蜂化学识别行为的影响等。

参考文献（References）

Arthur AP, Mason PG, 1986. Life history and immature stages of the parasitoid *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae), reared

on the bertha armyworm *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae). *Can. Entomol.*, 118(5): 487 - 491.

Ban L, Scaloni A, D'Ambrosio C, Zhang L, Yahn Y, Pelosi P, 2003. Biochemical characterization and bacterial expression of an odorant-binding protein from *Locusta migratoria*. *Cell Mol. Life Sci.*, 60 (2): 390 - 400.

Chun MW, Schoonhoven LM, 1973. Tarsal contact chemosensory hairs of the large white butterfly *Pieris brassicae* and their possible role in oviposition behaviour. *Entomol. Exp. Appl.*, 16(3): 343 - 357.

Dethier VG, Crnjar RM, 1982. Candidate codes in the gustatory system of caterpillars. *J. Gen. Physiol.*, 79(4): 549 - 569.

Dong WX, Zhang ZN, 2006. Antennal sensilla of *Microplitis mediator* observed with scanning electron microscope. *Acta Entomol. Sin.*, 49 (6): 1054 - 1059. [董文霞, 张钟宁, 2006. 中红侧沟茧蜂触角感受器的扫描电镜观察. 昆虫学报, 49(6): 1054 - 1059]

Galindo K, Smith DP, 2001. A large family of divergent *Drosophila* odorant-binding proteins expressed in gustatory and olfactory sensilla. *Genetics*, 159(3): 1059 - 1072.

Gu SH, Wang WX, Wang GR, Zhang XY, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2011. Functional characterization and immunolocalization of odorant binding protein 1 in the lucerne plant bug, *Adelphocoris lineolatus* (Goeze). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 77: 81 - 98.

Hekmatscafe DS, Scafe CR, Mckinney AJ, Tanouye MA, 2002. Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.*, 12(9): 1357 - 1369.

Jeong YT, Shim J, Oh SR, Yoon HI, Kim CH, Moon SJ, Montell C, 2013. An odorant-binding protein required for suppression of sweet taste by bitter chemicals. *Neuron*, 79(4): 725 - 737.

Koh TW, He Z, Gorur-Shandilya S, Menuz K, Larter NK, Stewart S, Carlson JR, 2014. The *Drosophila* IR20a clade of ionotropic receptors are candidate taste and pheromone receptors. *Neuron*, 83 (4): 850 - 865.

Leal WS, Nikonova L, Peng G, 1999. Disulfide structure of the pheromone binding protein from the silkworm moth *Bombyx mori*. *FEBS Lett.*, 464(1 - 2): 85 - 90.

Li KM, Zhang YJ, Wu KM, Guo YY, 2012. Antenna ultrastructure of *Microplitis mediator*. *Sci. Agric. Sin.*, 45(17): 3522 - 3530. [李科明, 张永军, 吴孔明, 郭予元, 2012. 中红侧沟茧蜂触角超微结构. 中国农业科学, 45(17): 3522 - 3530]

Ma L, Li ZQ, Bian L, Cai XM, Luo ZX, Zhang YJ, Chen ZM, 2016. Identification and comparative study of chemosensory genes related to host selection by legs transcriptome analysis in the tea geometrid *Ectropis obliqua*. *PLoS ONE*, 11(3): e0149591.

Pelosi P, Iovinella I, Felicioli A, Dani FR, 2014. Soluble proteins of chemical communication: an overview across arthropods. *Front. Physiol.*, 5: 320.

Robertson HM, Martos R, Sears CR, Todres EZ, Walden KKO, Nardi JB, 1999. Diversity of odourant binding proteins revealed by an expressed sequence tag project on male *Manduca sexta* moth antennae. *Insect Mol. Biol.*, 8(4): 501 - 518.

Scaloni A, Monti M, Angeli S, Pelosi P, 1999. Structural analysis and disulfide-bridge pairing of two odorant-binding proteins from *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266(2): 386 - 391.

Schoonhoven LM, Loon JJAV, Dicke M, 2005. Insect-Plant Biology. 2nd ed. Oxford University Press, Oxford. 183 - 189.

Shanbhag S, Park SK, Pikielny C, Steinbrecht R, 2001. Gustatory organs of *Drosophila melanogaster*: fine structure and expression of the putative odorant-binding protein PBPRP2. *Cell Tissue Res.*, 304 (3): 423 - 437.

Steinbrecht RA, 1992. Experimental morphology of insect olfaction: tracer studies, x-ray microanalysis, autoradiography, and immunocytochemistry with silkmoth antennae. *Microsc. Res. Tech.*, 22(4): 336 - 350.

Swarup S, Morozova TV, Sridhar S, Nokes M, Anholt RR, 2014. Modulation of feeding behavior by odorant-binding proteins in *Drosophila melanogaster*. *Chem. Senses*, 39(2): 125 - 132.

Tang QB, Ma Y, Huang LQ, Wang CZ, 2011. Advances in mechanisms of taste perception of insects. *Acta Entomol. Sin.*, 54(12): 1433 - 1444. [汤清波, 马英, 黄玲巧, 王琛柱, 2011. 昆虫味觉感受机制研究进展. 昆虫学报, 54(12): 1433 - 1444]

Tegoni M, Campanacci V, Cambillau C, 2004. Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. *Trends Biochem. Sci.*, 29(5): 257 - 264.

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5828): 161 - 163.

Wei Y, 2016. Cloning and Functional Characterization of Homologous Odorant Binding Protein 11 of Two Mirids. MSc Thesis, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [魏宇, 2016. 两种盲蝽同源气味结合蛋白基因 OBP11 的克隆和功能研究. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文]

Xiu WM, Dong SL, 2007. Molecular characterization of two pheromone binding proteins and quantitative analysis of their expression in the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *J. Chem. Ecol.*, 33 (5): 947 - 961.

Yu F, Zhang SG, Zhang L, Pelosi P, 2009. Intriguing similarities between two novel odorant-binding proteins of locusts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 385(3): 369 - 374.

Yu HZ, 2007. Research progress of insect antennal sensilla. *J. Anhui Agric. Sci.*, 35(14): 4238 - 4240. [余海忠, 2007. 昆虫触角感受器研究进展. 安徽农业科学, 35(14): 4238 - 4240]

Zacharuk RY, Mittler TE, Radovsky FJ, Resh VH, 1980. Ultrastructure and function of insect chemosensilla. *Annu. Rev. Entomol.*, 25(1): 27 - 47.

Zhang YF, Huang LQ, Ge F, Wang CZ, 2011. Tarsal taste neurons of *Helicoverpa assulta* (Guenée) respond to sugars and amino acids, suggesting a role in feeding and oviposition. *J. Insect Physiol.*, 57 (10): 1332 - 1340.

Zhang YF, van Loon JJA, Wang CZ, 2010. Tarsal taste neuron activity and proboscis extension reflex in response to sugars and amino acids in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *J. Exp. Biol.*, 213: 2889 - 2895.

Zhang YN, Jin JY, Jin R, Xia YH, Zhou JJ, Deng JY, Dong SL, 2013. Differential expression patterns in chemosensory and non-chemosensory tissues of putative chemosensory genes identified by transcriptome analysis of insect pest the purple stem borer *Sesamia inferens* (Walker). *PLoS ONE*, 8(7): e69715.

Zhou JJ, 2010. Odorant-binding proteins in insects. *Vitam. Horm.*, 83: 241 - 272.

Zhou JJ, He XL, Pickett JA, Field LM, 2008. Identification of odorant-binding proteins of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: genome annotation and comparative analyses. *Insect Mol. Biol.*, 17(2): 147 - 163.

(责任编辑: 赵利辉)